

**METHOD FOR DETECTING POLYNUCLEOTIDE**

Patent Number: JP7023799  
Publication date: 1995-01-27  
Inventor(s): OKANO KAZUNOBU; others:  
Applicant(s): HITACHI LTD  
Requested Patent:  JP7023799  
Application JP19930172863 19930713  
Priority Number(s):  
IPC Classification: C12Q1/68  
EC Classification:  
Equivalents:

---

**Abstract**

---

**PURPOSE:** To provide a method for detecting polynucleotide, capable of carrying out a reaction at a definite temperature and detecting DNA in high sensitivity by reacting a target nucleotide with ribonuclease and a nucleic acid synthetase under specific conditions using a nucleic acid probe composed of a ribonucleotide and a deoxyribonucleotide.

**CONSTITUTION:** A nucleic acid composed of deoxyribonucleotide parts 11 and 13, a ribonucleotide part 12 and material 14 is hybridized with the sample DNA101. The resultant complex 102 is made to react with a DNA polymerase 107 and a ribonuclease 106 in the presence of deoxyribonucleotide 3 phosphoric acids 103 and 104 and dideoxynucleotide 3 phosphoric acid 105 different in series of base from deoxyribonucleotide 3 phosphoric acid. Thereby, 3' terminal is elongated by definite base length and a ribonucleotide part 109 is cleaved and a labeled deoxyribonucleotide 108 having definite length is amplified.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - I2

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-23799

(43)公開日 平成7年(1995)1月27日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>

C 12 Q 1/68

識別記号

府内整理番号

Z 9453-4B

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数8 OL (全8頁)

(21)出願番号 特願平5-172863

(22)出願日 平成5年(1993)7月13日

(71)出願人 000005108

株式会社日立製作所

東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

(72)発明者 岡野 和宣

東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地

株式会社日立製作所中央研究所内

(72)発明者 神原 秀記

東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地

株式会社日立製作所中央研究所内

(72)発明者 川本 和子

東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地

株式会社日立製作所中央研究所内

(74)代理人 弁理士 小川 勝男

最終頁に続く

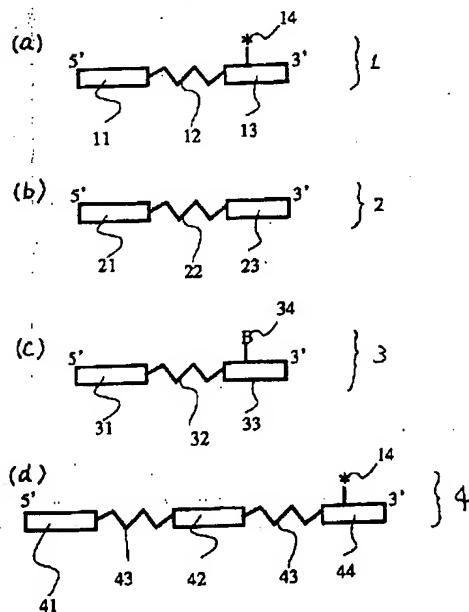
(54)【発明の名称】 ポリヌクレオチドの検出方法

(57)【要約】

【構成】核酸プローブにリボヌクレオチドとデオキシリボヌクレオチドで構成されたものを用い、標的ポリヌクレオチドに結合させる。次に、少なくとも一種のデオキシリボヌクレオチド3'リン酸とそれとは異なる塩基種のダイデオキシヌクレオチド3'リン酸共存下で、RNA分解酵素と核酸合成酵素を反応させることで3'末端を一定塩基長伸長させ、リボヌクレオチド部分を切断する。伸長分解したプローブは蛍光標識されていて、元の核酸プローブとはサイズが異なるので電気泳動で検出される。

【効果】一定温度の反応で伸長分解したプローブとして增幅検出できる。

図1



1

2

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】標的となるポリヌクレオチドの特定部位の塩基配列と相補的な配列を有する核酸プローブがリボヌクレオチドとデオキシリボヌクレオチドで構成されたもので、デオキシリボヌクレオチドの少なくとも一ヵ所に標識物が結合したものを用い、核酸プローブを標的のポリヌクレオチドにハイブリッド形成条件下で結合させ、少なくとも一種のデオキシリボヌクレオチド3'リン酸とデオキシリボヌクレオチド3'リン酸とは異なる塩基種のダイデオキシヌクレオチド3'リン酸の共存下でRNA分解酵素と核酸合成酵素を反応させ、3'末端を一定塩基長伸長させ、リボヌクレオチド部分を切断し、一定長になった標識デオキシリボヌクレオチドの生成量から標的のポリヌクレオチドの検出を行うことを特徴とするポリヌクレオチドの検出方法。

【請求項2】標的となるポリヌクレオチドの特定部位の塩基配列と相補的な配列を有する核酸プローブがリボヌクレオチドとデオキシリボヌクレオチドで構成されたもので、核酸プローブを標的のポリヌクレオチドにハイブリッド形成条件下で結合させ、少なくとも一種のデオキシリボヌクレオチド3'リン酸とデオキシリボヌクレオチド3'リン酸とは異なる塩基種の標識ダイデオキシヌクレオチド3'リン酸の共存下でRNA分解酵素と核酸合成酵素を反応させ、3'末端を一定塩基長伸長させ、リボヌクレオチド部分を切断し、一定長になった3'末端標識デオキシリボヌクレオチドの生成量から標的のポリヌクレオチドの検出を行うことを特徴とするポリヌクレオチドの検出方法。

【請求項3】請求項1において、ダイデオキシヌクレオチド三リンが標識体の結合したものであるポリヌクレオチドの検出方法。

【請求項4】請求項1において、ダイデオキシヌクレオチド三リンがビオチンの結合したもので、一定長になった3'末端ビオチン化デオキシリボヌクレオチドをアビジンあるいはストレプトアビジンを固定した担体を用いて分離する工程を設けたポリヌクレオチドの検出方法。

【請求項5】請求項2において、核酸プローブがリボヌクレオチドとデオキシリボヌクレオチドで構成されたもので、デオキシリボヌクレオチドの少なくとも一ヵ所にビオチンが結合したものを用い、一定長になったビオチン化デオキシリボヌクレオチドをアビジンあるいはストレプトアビジンを固定した担体を用いて分離する工程を設けたポリヌクレオチドの検出方法。

【請求項6】請求項1, 2, 3, 4または5において、標識物が蛍光体であるポリヌクレオチドの検出方法。

【請求項7】請求項3において、核酸プローブの標識物と標識ダイデオキシヌクレオチド3'リン酸の標識物がそれぞれ異なる蛍光体で、前記二種の蛍光体はエネルギー移動を起こすものであるポリヌクレオチドの検出方法。

【請求項8】請求項1, 2, 3, 4, 5, 6または7に

おいて、3'末端のデオキシリボヌクレオチド部分が3'ないし7塩基長で、その5'末端側の少なくとも一ヵ所にリボヌクレオチド部分を持つ構造で、3'末端側に伸長する塩基長が3'ないし7塩基長であるポリヌクレオチドの検出方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明はDNAの検出及び遺伝子診断法に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】遺伝病やウィルス等による感染症の診断にDNA等のポリヌクレオチドの検出が用いられている。検査対象となるウィルスのコピー数は少ない場合には数十コピー以下であり、ポリメラーゼ チェイン リアクション (PCR; Polymerase Chain Reaction) 法によりDNAを増殖し、検出する方法がネイチャー (Nature) 350, 91-92 (1991) あるいは特開昭61-274697号公報に開示されている。PCR法はDNAの特定の領域を増殖するもので、対象となる二本鎖DNAの

(+)鎖及び(-)鎖にハイブリダイズする二種のオリゴマではさまれる領域のDNAを増殖する。

【0003】二本鎖DNAを高温(～90℃)下で変性し、(+)鎖と(-)鎖に分離する。次いで降温(～60℃)し、それぞれにDNAオリゴマをハイブリダイズさせ、Taq由来など耐熱性DNAポリメラーゼで相補鎖を合成する。再び昇温して二対の(+)鎖および(-)鎖を作製する。以下、降温と昇温の熱サイクルを繰り返し、DNA鎖を倍々と増やしていく。実際には1回の熱サイクルで平均1.6倍程度になることが知られており、30回繰り返すと10<sup>6</sup>倍にもコピー数を増やすことが出来る。このようにして得たDNAをゲル電気泳動分離し、増幅されたDNAの長さを調べることにより標的DNAの有無を診断している。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】この方法ではDNAコピーの増殖に高価な耐熱性酵素を必要とすること、昇温と降温を繰り返す手間と時間がかかること、二種のDNA増殖用オリゴマ(プライマ)が必要である難点がある。特に対象によっては2つのプライマをうまく選べないこともある。更に電気泳動によりPCR産物を分離する必要があるため手間と労力を必要とする難点があった。また従来技術では、標的ポリヌクレオチドの特定部位を増幅できるので高感度であるが、検出にRI標識物を用いたりエチジウムプロマイドを用いた蛍光染色法を用いている。これらは用手法であり、自動化に適さない。また、RI標識物を用いる場合は作業者の放射線被爆という問題もあった。

【0005】本発明の目的は、簡便で高感度な標的ポリヌクレオチド即ちDNAの検出法を提供することにある。より具体的には、本発明の目的は標的ポリヌクレオ

チド試料とハイブリッド体を形成した核酸プローブを一定温度の酵素反応で増幅する手段を提供することにある。また自動化に適した標的ポリヌクレオチドの検出手法を提供することにある。また本発明の他の目的は、核酸プローブの非R I 標識を実現して、作業者を放射線被爆から開放することと作業場所への制約を無くすことにある。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成するため本発明では、以下のような手法を用いる。

【0007】まず、次の(1)乃至(3)のいずれかの方法によって核酸プローブを一定温度の酵素反応で増幅する。

【0008】(1)核酸プローブがリボヌクレオチドとデオキシリボヌクレオチドで構成されたもので、デオキシリボヌクレオチドの少なくとも一ヵ所に標識物が結合したものを用いる。この核酸プローブを標的ポリヌクレオチドにハイブリッド形成条件下で結合させる。次に、少なくとも一種のデオキシリボヌクレオチド3'リン酸とデオキシリボヌクレオチド3'リン酸とは異なる塩基種のダイデオキシヌクレオチド3'リン酸の共存下でリボヌクレアーゼ エイチ (Ribonuclease H) などのRNA分解酵素と核酸合成酵素を反応させることで3'末端を一定塩基長伸長させ、リボヌクレオチド部分を切断する。この一連の伸長分解反応で生成するプローブ産物の塩基長を10塩基程度かそれ以下になる様に元の核酸プローブを設計する。このような短いプローブ産物は標的ポリヌクレオチドとの水素結合を保持出来なくなるため、短くなったプローブ産物は標的ポリヌクレオチドから遊離し、元の標的ポリヌクレオチドを再生する。再生した、標的ポリヌクレオチドは再度核酸プローブと結合し、一連の伸長分解反応が起きる。一定時間反応させる間にこのサイクルを複数回繰り返し行わせる。

【0009】(2)リボヌクレオチドとデオキシリボヌクレオチドで構成された核酸プローブを標的ポリヌクレオチドにハイブリッド形成条件下で結合させ、少なくとも一種のデオキシリボヌクレオチド3'リン酸と該デオキシリボヌクレオチド3'リン酸とは異なる塩基種の標識ダイデオキシヌクレオチド3'リン酸共存下でRNA分解酵素と核酸合成酵素を反応させる。この反応で3'末端を一定塩基長伸長させて3'末端に標識すると共に、リボヌクレオチド部分を切断し、一定長の3'末端標識デオキシリボヌクレオチドを生成する。(1)と同様に、この一連の伸長分解反応で生成するプローブ産物の塩基長を10塩基程度かそれ以下になる様に元の核酸プローブを設計し、核酸プローブの伸長分解-短くなったプローブ産物の遊離と標的ポリヌクレオチドの再生のサイクルを複数回繰り返し行わせる。

【0010】(3)核酸プローブがリボヌクレオチドとデオキシリボヌクレオチドで構成されたもので、該デオ

キシリボヌクレオチドの少なくとも一ヵ所に標識物が結合したものを用いる。標的ポリヌクレオチドに結合させた後、少なくとも一種のデオキシリボヌクレオチド3'リン酸と該デオキシリボヌクレオチド3'リン酸とは異なる塩基種で標識体の結合したダイデオキシヌクレオチド3'リン酸共存下でRNA分解酵素と核酸合成酵素を反応させる。この反応で3'末端を一定塩基長伸長させて3'末端に標識し、リボヌクレオチド部分を切断し、中間塩基部と3'末端が標識された一定長のデオキシリボヌクレオチドを生成する。(1)と同様に、この一連の伸長分解反応で生成するプローブ産物の塩基長を10塩基程度かそれ以下になる様に元の核酸プローブを設計し、核酸プローブの伸長分解-短くなったプローブ産物の遊離と標的ポリヌクレオチドの再生のサイクルを複数回繰り返し行わせることとした。

【0011】次いで、次の(4)または(5)の方法により標的ポリヌクレオチドを検出する。

【0012】(4)上記(1)において、ダイデオキシヌクレオチド3'リン酸がビオチンの結合したもので、一定長になった3'末端ビオチン化デオキシリボヌクレオチドをアビシンあるいはストレプトアビシンを固定した抗体を用いて分離する。

【0013】(5)上記(2)または(3)において、核酸プローブのデオキシリボヌクレオチド部分の少なくとも一ヵ所にビオチンが結合したものを用い、一定長になったビオチン化プローブをアビシンあるいはストレプトアビシンを固定した抗体を用いて分離する工程を設けることとした。

【0014】また、次の(6)または(7)の方法により核酸プローブの非R I 標識を実現する。

【0015】(6)上記(1)、(2)、(3)において、標識物に蛍光体を用いる。

【0016】(7)上記(3)では、核酸プローブのデオキシヌクレオチド部の標識物と標識ダイデオキシヌクレオチド3'リン酸の標識物がそれぞれ異なる蛍光体で構成され、前記二種の蛍光体はエネルギー移動を起こすようになり、一方の蛍光体を励起することで他方の蛍光体を間接的に励起する。

## 【0017】

【作用】標的核酸が、一本鎖DNAなどの一本鎖核酸の場合にはそのまま試料とすることができます。また、二本鎖DNAの場合には、熱あるいはアルカリ変性してもよいが、ハイブリッド形成条件下で標的核酸同士のハイブリッド形成が起こり、核酸プローブとのハイブリッド形成効率が低下するので、エキソヌクレアーゼIIIのような二本鎖特異的ヌクレアーゼで処理して一本鎖にしておく方がよい。

【0018】リボヌクレオチドとデオキシリボヌクレオチドで構成された核酸プローブは、16塩基長以上ものであれば標的ポリヌクレオチドと結合することが出来

る。デオキシリボヌクレオチド3リン酸とダイデオキシリクレオチド3リン酸の共存下で核酸合成酵素を反応させると、核酸プローブをプライマとして3'末端に塩基を付加することができる。ここでデオキシリボヌクレオチド3リン酸とダイデオキシリクレオチド3リン酸を別の種類の塩基種にしておけば、最初のダイデオキシリクレオチド3リン酸結合部位で伸長反応を停止することが出来る。

【0019】核酸合成酵素による伸長反応はダイデオキシリクレオチド3リン酸結合部位で100%反応が停止するとは限らないので、ダイデオキシリクレオチド3リン酸結合部位の次の3'側塩基部分に相当するデオキシリクレオチド3リン酸は加えない方が伸長反応を確実に停止できる。

【0020】核酸合成酵素による伸長反応を行うときにRibonuclease IIのようなDNAとRNAのハイブリダイゼーション形成部分のRNA部分を特異的に分解するRNA分解酵素を用いれば、標的ポリヌクレオチドにハイブリダイゼーション条件下で結合した核酸プローブのリボヌクレオチド部分を分解することが出来る。この時、デオキシリボヌクレオチド部分即ち標的ポリヌクレオチドや核酸プローブのデオキシリボヌクレオチド部分や伸長した部分は分解されない。このため、核酸プローブは5'末端側が短くなり、3'末端側が長くなる。

【0021】伸長する長さを2~5塩基とし、分解された核酸プローブの全長を10塩基以下になるようにプローブを設計すれば、このように短いプローブは標的ポリヌクレオチドとの水素結合を保持出来なくなる。このため一連の反応で伸長分解を受けた核酸プローブは標的ポリヌクレオチドから遊離し、元の標的ポリヌクレオチドを再生する。通常、核酸プローブは大過剰存在するので、再生した標的ポリヌクレオチドは再度核酸プローブと結合し、一連の分解伸長反応が起きる。このサイクルは核酸プローブが消費しつくされるまで起きるので、分解伸長した核酸プローブは増幅产生される。

【0022】本発明では、核酸プローブの一部に蛍光体を結合したものを用いるか、蛍光体の結合したダイデオキシリボヌクレオチドを用いて伸長反応の際の3'末端に蛍光体を導入するので、検出は蛍光検出で行うことが出来る。蛍光体にはフルオレッセイン、テトラメチルローダミン、ローダミンX、スルホローダミン101等を用いることが出来る。あるいは、核酸プローブの蛍光体と3'末端に導入される蛍光体の種類を変えておけば両蛍光体間のエネルギー移動を利用できるので、片方の蛍光体を励起して他方の蛍光体の蛍光を検出することが出来る。このような蛍光体の組合せとしてはフルオレッセインとスルホローダミン101等の組合せが有効である。

【0023】標的ポリヌクレオチドに結合して分解伸長した核酸プローブは分解されていないプローブや伸長する前に分解したプローブと塩基長が異なるために電気泳

動を用いて容易に分離検出できる。

【0024】ダイデオキシリクレオチド3リン酸がビオチンの結合したものを用いて分解伸長反応で3'末端にビオチンを導入したプローブはストレプトアビシン等を固定した担体で容易に捕捉できる。ビオチンが入らなかつたプローブ、即ち、3'末端の伸長が起きなかつたプローブ等は洗浄して除くことが出来るので、担体上の蛍光を測定することで分解伸長がおきたプローブ量、即ち、試料中の標的ポリヌクレオチド量を知ることが出来る。

10 同様に、核酸プローブのデオキシリボヌクレオチド部分にビオチンが結合したものを用いる場合でも、分解伸長反応で3'末端に蛍光体が導入されるケースでは担体上の蛍光強度を測定することで試料中の標的ポリヌクレオチド量を知ることが出来る。

【0025】

【実施例】

(実施例1) 核酸プローブを一定温度の酵素反応で増幅する本発明について説明する。本発明でのDNAプローブの構造を図1に記した。図中の標識体にはスルホローダミン101蛍光体を用いたが、他の蛍光色素でも可能である。

20 【0026】各プローブの基本的な動作を図2ないし図4を用いて説明する。第1の例は図2に示す様に、試料に一本鎖DNA101とこれに相補的な塩基配列を持つ図1(a)に記載の核酸プローブ1を用いる。核酸プローブ1は5'末端に10塩基長のデオキシリボヌクレオチド部分11があり、その3'側に8塩基長のリボヌクレオチド12が続き、5'末端側が6塩基長のデオキシリボヌクレオチド部分13からなる全長24塩基長のハイブリッドオリゴヌクレオチドである。デオキシリボヌクレオチド部分13の5'から4番目の塩基にはスルホローダミン101蛍光体が結合している。

30 【0027】図2のように、試料DNA101と核酸プローブ1を37℃で混合すると両者は相補的な配列を持っているためにハイブリダイズし、102のような複合体を形成する。ここで、二種のデオキシリボヌクレオチド三磷酸103、104とダイデオキシリボヌクレオチド三磷酸105とDNAポリメラーゼであるシーケネス(東洋紡績株式会社製)107とRNA分解酵素であるRNase H(宝酒造株式会社製)106を共存させておく。

40 【0028】試料DNA101に結合した核酸プローブ1の3'末端にはシーケネスによりデオキシリボヌクレオチド三磷酸が3塩基長分伸長した後、ダイデオキシリボヌクレオチド三磷酸が結合し反応が停止する。また、試料DNA101に結合した核酸プローブ1のリボヌクレオチド部分はRNase Hにより分解される。伸長と分解を受けたプローブは約10塩基長になる。ここで、伸長反応が起きる前にRNase Hによる分解を受けた核酸プローブは6塩基長になるので試料DNA101から遊離

してしまうので、その後の伸長反応は起きない。このように伸長反応が起きずに分解を受けたものは6塩基長で、伸長反応を受けた後に分解したフラグメント108は10塩基長であるので両者は電気泳動的に分離することが出来る。

【0029】伸長反応と分解を受けて10塩基長になったフラグメント108は37℃では試料DNA101から遊離し、元の試料DNA101を再生する。再生した試料DNA101は、再度、核酸プローブ1と結合し、伸長分解の一連のサイクルを繰り返す。

【0030】実際に、 $1 \times 10^{-18}$  molの標的DNA101と $1 \times 10^{-13}$  molの核酸プローブ1をデオキシリボヌクレオチド三磷酸であるdTとdCとダイデオキシリボヌクレオチド三磷酸dG共存下で1ユニットのシーケネースと1ユニットのRNase Hを37℃30分間反応させた。反応液を95℃2分間加熱し、反応を停止した後、電気泳動で分離分析した。電気泳動には日立WSQ-3000型DANシーケンサの励起用レーザをHe/Neレーザ(633nm)に変え、更に、集光効率を上げるために電気泳動版にシリンドリカルレンズを貼付で高感度検出できるように改造して用いた。

【0031】その結果、伸長反応を受けた後に分解したフラグメントが未反応のプローブや伸長反応を受ける前に分解されたフラグメントと分離して検出できた。検出された全ての蛍光ピークの強度総和と伸長反応を受けた後に分解したフラグメントのピークの強度の比から伸長反応を受けた後に分解したフラグメント量を計算したところ、標的DNAに対し約200倍のフラグメントが生成していた。このことから本実施例を用いれば、一定温度の酵素反応で核酸プローブの増幅を起こすことができる事が確認された。

【0032】本実施例では核酸プローブに図1の(a)の構造のものを用いたが、図1の(d)のように、リボヌクレオチド4が複数部位ある核酸プローブ4でも、同様な結果を得ることが出来る。

【0033】(実施例2) 本実施例では図1(b)に記載の核酸プローブ2を用いる。核酸プローブ2は5'末端に10塩基長のデオキシリボヌクレオチド部分21があり、その3'側に8塩基長のリボヌクレオチド22が続き、5'末端側が6塩基長のデオキシリボヌクレオチド部分23からなる全長24塩基長のハイブリッドオリゴヌクレオチドである。蛍光体は結合していない。

【0034】図3のように、試料DNA101と核酸プローブ1を37℃で混合すると両者は相補的な配列を持っているためにハイブリダイズし、202のような複合体を形成する。ここで、二種のデオキシリボヌクレオチド三磷酸103、104と蛍光標識ダイデオキシリボヌクレオチド三磷酸205とDNAポリメラーゼであるシーケネース(東洋紡績株式会社製)107とRNA分解酵素であるRNase H(宝酒造株式会社製)106を共存

させておく。蛍光標識にはスルホローダミン101蛍光体を用いた。試料DNA101に結合した核酸プローブ2の3'末端にはシーケネースによりデオキシリボヌクレオチド三磷酸が3塩基長分伸長した後、蛍光標識ダイデオキシリボヌクレオチド三磷酸205が結合し、反応が停止する。また、試料DNA101に結合した核酸プローブ2のリボヌクレオチド部分22はRNase Hにより分解される。

【0035】伸長と分解を受けたプローブは約10塩基長になる。実施例1と同様に、伸長と分解を受けたプローブ208は試料DNA101から遊離して元の試料DNA101を再生する。再生した試料DNA101は再度核酸プローブ2と結合し、伸長分解の一連のサイクルを繰り返す。

【0036】実施例1と同様に、 $1 \times 10^{-18}$  molの標的DNA101と $1 \times 10^{-13}$  molの核酸プローブ2をデオキシリボヌクレオチド三磷酸であるdTとdCと蛍光標識ダイデオキシリボヌクレオチド三磷酸dG共存下で1ユニットのシーケネースと1ユニットのRNase Hを37℃30分間反応させた。反応液を95℃で2分間加熱し、反応を停止した後、後の電気泳動分析の妨害にならない程度にゲルfiltrationを行い、未反応の蛍光標識ダイデオキシリボヌクレオチド三磷酸を大まかに取り除く。続いで電気泳動で分離分析した。

【0037】その結果、実施例1と同様に、伸長反応を受けた後に分解したフラグメントが未反応のプローブや伸長反応を受ける前に分解されたフラグメントと分離して検出できた。本実施例では一連の反応で3'末端に蛍光体が取り込まれたものを検出することで、標的ポリヌクレオチドに対する選択性を上げる効果がある。

【0038】本実施例では、核酸プローブ2を用いたが、図1(c)の核酸プローブ3のように、ビオチン34が結合したものを用いることもできる。

【0039】この場合、上記手法と同様の操作で、3'末端にデオキシリボヌクレオチド3リン酸を3塩基長分伸長した後、蛍光標識ダイデオキシリボヌクレオチド3リン酸を結合させる。同時にRNase Hでリボヌクレオチド部分32を分解し、分解伸長フラグメントを得る。

【0040】続いて、反応液を電気泳動で分離し、電気泳動担体ゲルから溶出してくる分解伸長フラグメントを含むフラクションをストレプトアジピンを固定したマイクロプレートに分集する。

【0041】この操作で、ビオチンの結合したフラグメントはマイクロプレートに結合する。この時点で、電気泳動で分離不十分のために残されている未反応の蛍光標識ダイエオキシリボヌクレオチドは分離除去される。マイクロプレート表面に結合した蛍光体由来の蛍光を測定することで、上記実施例1と同様の結果を得ることができた。

【0042】(実施例3) 本実施例ではスルホローダミ

ン101を蛍光標識した核酸プローブ1とスルホローダミン101を結合した蛍光標識ダイデオキシリボヌクレオチド三磷酸を用いてエネルギー移動で標的ポリヌクレオチドを検出する例について述べる。

【0043】実施例1及び2と同様に図4のように、試料DNA101と核酸プローブ1をハイブリダイズさせ、102のような複合体を形成する。一連の反応で3'末端は3塩基長分伸長した後、蛍光標識ダイデオキシリボヌクレオチド三磷酸が結合し反応が停止する。また、核酸プローブのリボヌクレオチド部分はRNase Hにより分解される。伸長と分解を受けたプローブは約10塩基長になり、二種の蛍光体の結合した伸長と分解を受けたプローブ208が得られる。実施例1と同様に、伸長と分解を受けたプローブは試料DNAから遊離して元の試料DNA101を再生する。再生した試料DNAは、再度、核酸プローブと結合し、伸長分解の一連のサイクルを繰り返す。

【0044】実施例1と同様に、 $1 \times 10^{-18}$  molの標的DNA101と $1 \times 10^{-18}$  molの核酸プローブ1をデオキシリボヌクレオチド三磷酸であるdTとdCと蛍光標識ダイデオキシリボヌクレオチド三磷酸dG共存下で1ユニットのシーケネースと1ユニットのRNase Hを37°C 30分間反応させた。反応液を95°C 2分間加熱し反応を停止した後、電気泳動で分離分析した。電気泳動には日立WSQ-3000型DANシーケンサを用いた。レーザーは488 nmのアルゴンレーザーを用いた。検出には605 nmないし640 nmのバンドパスフィルタを用いてスルホローダミン101由来の蛍光を検出した。

【0045】その結果、伸長反応を受けた後に分解したフラグメントが未反応のプローブや伸長反応を受ける前に分解されたフラグメントと分離して検出できた。蛍光強度より増幅した分解伸長フラグメント量を求めるとき標的DNAに対し約100倍の分解伸長フラグメントが増幅して得られることがわかった。

【0046】本実施例では二種の蛍光体が取り込まれたフラグメントをエネルギー移動を用いて検出するので、反応生成物以外の電気泳動分離ピークの影響を抑えることができる、実施例2のような反応後のゲル通過がいらなくなり、より検出が容易になる利点がある。

【0047】(実施例4)図5に示すように、ビオチン結合ダイデオキシリボヌクレオチド三磷酸408を用いて蛍光標識プローブ1を他の実施例と同様な反応を行い分解伸長し、3'末端にビオチンを導入した分解伸長フ

ラグメント418を得る。反応液をストレプトアビシン410の結合したマイクロプレート411に移し、30分間攪拌する。この工程で、ビオチンを導入した分解伸長フラグメント409がマイクロプレート表面に捕捉される。十分洗浄した後に、マイクロプレート表面に結合した蛍光体由来の蛍光を測定する。この方法を用いて他の実施例と同様に $1 \times 10^{-18}$  molの標的DNAを測定できた。検出された蛍光強度から標的DNAに対し約80倍の分解伸長フラグメントが増幅して得られることがわかった。

## 【0048】

【発明の効果】極微量存在する標的DNAを検出する核酸プローブがリボヌクレオチドとデオキシリボヌクレオチドで構成されたものを用い、デオキシリボヌクレオチド3リン酸とデオキシリボヌクレオチド3リン酸とは異なる塩基種のダイデオキシリボヌクレオチド3リン酸共存下でRNA分解酵素と核酸合成酵素を反応させることで3'末端を一定塩基長伸長させ、リボヌクレオチド部分を切断する方法を用いれば、一連の反応で生成した分解伸長フラグメントとして増幅できる。この反応は、一定の温度で行える利点がある。標的DNAを分解伸長フラグメントとして増幅できるので、標的DNAを高感度に検出できる。

【0049】また、核酸プローブ内とダイデオキシリボヌクレオチド3リン酸で伸長した末端に蛍光体を導入する方法を組み合わせることで、種類の違う二種の蛍光体を導入し、エネルギー移動を用いて検出することで、より容易に分解伸長したフラグメントを検出できる。また、ビオチン化ダイデオキシリボヌクレオチド3リン酸を用いてプローブの3'末端にビオチンを導入することで、未反応プローブ等を容易に除ける方法を用いることにより装置化に適した方法にすることができる。

## 【図面の簡単な説明】

【図1】核酸プローブの説明図。

【図2】本発明の反応の一実施例の説明図。

【図3】本発明の反応の第二の実施例の説明図。

【図4】本発明の反応の第三の実施例の説明図。

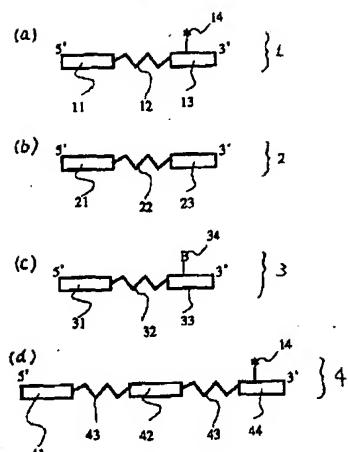
【図5】本発明の反応の第四の実施例の説明図。

## 【符号の説明】

40 11, 13, 21, 23, 31, 33, 41, 42, 44…デオキシリボヌクレオチド部分、12, 22, 32, 43…リボヌクレオチド部分、14…蛍光体、34…ビオチン。

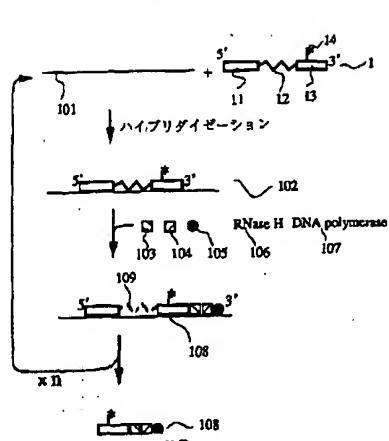
【図1】

図1



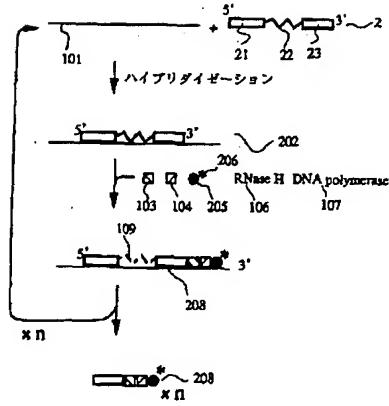
【図2】

図2



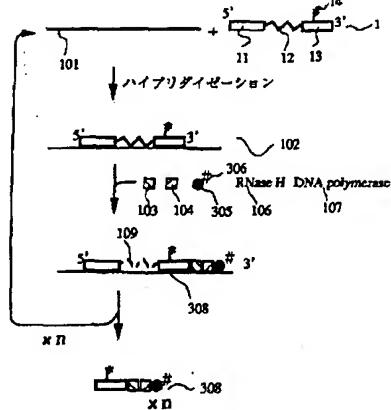
【図3】

図3



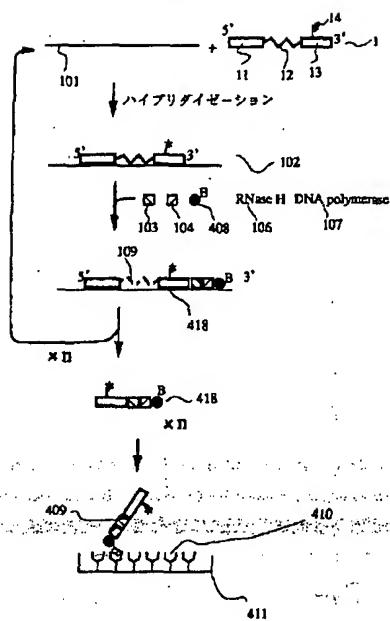
【図4】

図4



【図5】

図5



フロントページの続き

(72)発明者 古山 宏子  
 東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地  
 株式会社日立製作所中央研究所内